

# CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MEXICANAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* TÓXICAS PARA LARVAS DE LEPIDÓPTEROS Y COLEÓPTEROS

PATRICIA TAMEZ-G.\*, MARÍA M. IRACHETA\*, BENITO PEREYRA A.\*,  
LUIS J. GALÁN W.\*, RICARDO GÓMEZ F.\*, REYES S. TAMEZ G.\*, CRISTINA RODRÍGUEZ P.\*



La bacteria Gram (+), formadora de esporas *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), es el bioinsecticida más ampliamente utilizado. Una de sus características importantes es la producción de grandes inclusiones cristalíferas proteínicas durante su esporulación, las cuales contienen  $\delta$ -

endotoxinas o proteínas Cry, que son responsables de las propiedades entomocidas de muchas cepas de Bt no sólo contra muchas especies de insectos plagas de importancia en la agricultura, en los bosques y en la salud humana, sino también contra especies de ácaros, nematelmintos, platelmintos y sarcomastigofora.<sup>1</sup> Estudios previos han demostrado que de entre las cepas tóxicas para lepidópteros, GM-7 y GM-10 fueron similares al estándar HD-1 y al químico carbaril en su actividad insecticida contra lepidópteros plaga.<sup>2</sup> Además, se ha reportado que la cepa C-9 fue tóxica contra la conchuela del frijol,<sup>3</sup> y a los escarabajos de granos *Orizaephilus surinamensis* (L.) y *Tribolium castaneum* (Herbst).<sup>4</sup>

□ El presente artículo está basado en la investigación «Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros», galardonada con el Premio de Investigación UANL 2004 en la categoría de Ciencias de la Tierra y Agropecuarias, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2005.

La Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) ha publicado las guías para el registro de cepas para su empleo como bioinsecticidas, e incluye pruebas fisiometabólicas y de toxicidad en ratones mediante la inyección subcutánea de esporas. Los animales deben permanecer saludables por siete días después de la inoculación.<sup>5,6</sup> Estos lineamientos proveen las pruebas para demostrar su empleo de forma segura.<sup>7</sup> En este estudio se describe la caracterización biológica, la toxicidad y efectos histopatológicos hacia ratones de cuatro cepas mexicanas de Bt, y su potencial para controlar plagas de lepidópteros y coleópteros en campo.

## Materiales y métodos

### *Cepas (aislados) de Bt*

Las cepas nativas de México GM-7, GM-10, C4 y C9 se obtuvieron de la colección de bacilos entomopatógenos (Facultad de Ciencias Biológicas, UANL) y se caracterizaron siguiendo los criterios establecidos por la EPA, además se compararon con cepas de Bt clave HD como controles. Los ensayos se realizaron por triplicado.

\* Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

La identificación del serotipo se realizó de acuerdo a la caracterización del antígeno flagelar (antígeno H) según las pruebas reportadas previamente.<sup>11</sup>

Los bioensayos para determinar la actividad insecticida contra larvas de lepidópteros y de coleópteros se realizaron como se ha reportado previamente.<sup>3,8</sup> La actividad contra mosquitos se evaluó con larvas del cuarto estadio de *Anopheles albimanus*, *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*, con una mezcla de esporas-cristales de las cepas C-4, C-9, GM-7, GM-10, y de la cepa HD-225 (*Bt israelensis*) como control positivo. Posteriormente se depositaron doce larvas de mosquitos por vaso, y se incubaron en la oscuridad a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $60 \pm 5\%$  RH. El porcentaje de mortalidad se registró a las dos, doce y 72 h después de la aplicación.

Las cepas se caracterizaron bioquímicamente siguiendo la norma del *Manual de Bergy*,<sup>8</sup> probando fuentes de carbono y actividad enzimática ya reportadas para *Bt*.<sup>9-11</sup>

Para determinar la sensibilidad a diferentes antibióticos, se seleccionó la técnica de difusión recomendada por la Oficina Federal de Administración de Drogas de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA-USA, por sus siglas en inglés).<sup>12</sup> En cada experimento se observaron zonas de inhibición del crecimiento bacteriano en las placas, para cada antibiótico.<sup>8,12</sup>

También se determinó la sensibilidad de las cepas a los bacteriófagos R-41 y CP-51. Para esto, las cepas GM-7, GM-10, C-4 y C-9 se propagaron en medio YT (Sigma) por 24-48h a  $37^\circ\text{C}$ .<sup>13</sup> La sensibilidad se determinó por la zona de inhibición del crecimiento, se registraron como positivo las placas sin crecimiento, y como negativo si se observó abundante crecimiento. El perfil e inmunodetección de las proteínas del cristal se hizo según Pietrantonio y Gill.<sup>14</sup> Para las proteínas Cry1A, Cry3Aa y Cry7Aa se utilizó una mezcla de esporas-cristales de HD-73, *Bt (tenebrionis)* (cepa 4AA1 del *Bacillus Genetic Stock Center*, Ohio State University, Columbus) y GM-33 (*monterrey*), respectivamente. Para la obtención de Cry1Ab se utilizó una cepa de *E. coli* recombinante (4031), proporcionada por el Dr. Donald Dean (Universidad de Ohio, OH) y para Cry1B se empleó toxina activada proporcionada por el Dr. Juan Ferré (Universidad de Valencia, Valencia, España). Para el perfil de proteínas e inmunodetección, las cepas se analizaron en electroforesis SDS<sup>15,16</sup> y para cada experimento se realizaron dos

geles en condiciones idénticas; uno se utilizó para determinar el patrón de proteínas y se tiñó con azul de Coomasie y el otro fue electrotransferido a membranas de nitrocelulosa para los ensayos de inmunodetección, las cuales fueron realizadas como lo reportado por De Maagd *et al.*<sup>17</sup>

La identificación de genes *cry* se analizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).<sup>18</sup> Los genes *cry1* se identificaron de acuerdo a la clasificación reciente usando los iniciadores CJ-1 y CJ-2,<sup>19</sup> para la amplificación de genes de *cry1A* a *cry1G*.<sup>20</sup> Los genes *cry3* y *cry7/8* se identificaron usando los iniciadores Un3 y Un7/8.<sup>21</sup> Los productos de la amplificación por PCR se separaron mediante una electroforesis en geles de agarosa al 2%;<sup>22</sup> el número de bases se estimó por comparación con fragmentos de ADN de talla conocida, marcadores BIOLINE.

La detección de la  $\beta$ -exotoxina se realizó analizando las muestras con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la detección de la forma desfosforilada y fosforilada de la  $\beta$ -exotoxina, como fue previamente descrito por Hernyetz *et al.*<sup>23</sup>

Las pruebas de toxicidad *in vivo* para mamíferos se realizaron de acuerdo a Betz *et al.*<sup>5</sup> La cepa HD-41 se usó como control positivo para la producción de  $\beta$ -exotoxina.<sup>19</sup> Los ratones hembras Balb/c inicialmente obtenidos de Harlan Sprague-Dawley, Indianápolis, IN, fueron inoculados subcutáneamente con una suspensión de 200  $\mu\text{l}$  de  $10^6$  esporas/ml en PBS (preparada de la mezcla esporas-cristal en una relación 3:2, respectivamente), y se usó PBS como control negativo. Otro grupo de ratones fue inyectado con 200  $\mu\text{l}$  de  $10^7$  esporas/ml C-4 y C-9 para determinar el porcentaje de mortalidad. Una semana posterior a la inoculación, se evaluó la toxicidad mediante la evaluación de áreas necróticas en la piel de los animales tratados y por el análisis de alteraciones histopatológicas e infiltración de células en muestras de tejido. Las muestras de tejido se tiñeron con Giemsa.<sup>24</sup> Para determinar la fracción responsable de la necrosis dérmica utilizamos sobrenadante, esporas y cristales libres de esporas, purificados en 90-99%<sup>25</sup> 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadando ( $\beta$ -exotoxina),  $10^6$  esporas/ml o cristales ( $\delta$ -endotoxina). Las muestras de tejido de piel fueron procesadas para detectar la presencia de células viables de *Bt*.<sup>8</sup> Para determinar la participación del factor de necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en el tejido necrótico observado en la piel de los animales inyectados con la mezcla de esporas-cristales de C-4

y C-9, se realizó un experimento usando pentoxifilina, un inhibidor específico de la producción de TNF- $\alpha$ .<sup>24,26</sup> Se trataron grupos de cinco animales de (17-23g) inyectados con dosis de 200  $\mu$ l de  $10^6$  esporas-cristales/ml de las cepas C-4 ó C-9 como se describe anteriormente, y se inyectó con o sin pentoxifilina (150 mg/kg en PBS) usando PBS como control negativo. Diariamente se administró pentoxifilina hasta completar cinco dosis.

## Resultados

Las pruebas bioquímicas mostraron que todas las cepas evaluadas fermentan glucosa y arabinosa y asimilan maltosa, dulcitol y celobiosa, y muestran diferencias al metabolizar el resto de los carbohidratos evaluados, así como en los patrones de actividad enzimática para Bt (datos no mostrados). En las pruebas de sensibilidad a antibióticos esperados para bacterias de suelo (datos no mostrados), se observó que las cepas GM-7 y GM-10 (serovar *aizawai*) fueron susceptibles a los fagos R-41 y CP-51 (zonas sin crecimiento bacteriano), y las C-4 y C-9 (serovar *kumamotoensis*) fueron resistentes a la infección (datos no mostrados).

En las pruebas de actividad insecticida encontramos que sólo el control positivo, la cepa HD-225 (Bt *israelensis*), presentó actividad insecticida contra los mosquitos evaluados.

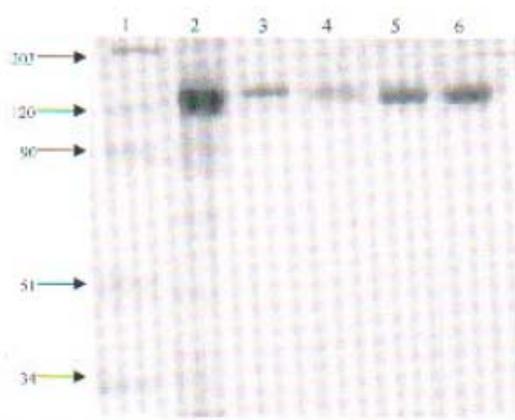


Fig. 1. SDS-PAGE, de las proteínas del cristal de cepas de *B. thuringiensis* con AntiCry1Ab. Las flechas indican los marcadores de referencia del carril 1: miosina (203kDa),  $\beta$ -galactosidasa (120kDa), albúmina de suero bovina (90kDa), ovo-albúmina (51.7kDa) y anhidrasa carbónica (34.1kDa). Los carriles 2-6, las cepas HD-73, C-4, C-9, GM-7 y GM-10.

Las cepas analizadas sintetizan proteínas de 130-140kDa (figura 1). Los resultados de inmunodetección mostraron que las cepas GM-7 y GM-10 (*aizawai*) reaccionan positivamente con el antisuero antiCry1Ab (datos no mostrados); C-4 y C-9 (*kumamotoensis*) no reaccionaron con los antisueros antiCry1Ac, antiCry1B, antiCry3 o antiCry7Aa (datos no mostrados).

El análisis PCR sugiere que las cepas C-4, GM-7 y GM-10 poseen al menos un gen *cry1* de 270-280 pb (figura 2). En las pruebas de PCR con los iniciadores para *cry3* y *cry7/8*, únicamente en la cepa C-9 y los controles positivos (Bt *tenebrionis* y HD-867) se observaron fragmentos de ADN amplificados de 420 y 570 pb (figura 3).

Los ratones inoculados con las cepas GM-7 y GM-10, así como los controles inyectados únicamente con PBS no desarrollaron alteraciones en piel una semana después de la administración subcutánea. Por el contrario, los animales inyectados con la mezcla de esporas de C-4, C-9 y la cepa productora de  $\beta$ -exotoxina, HD-41 (*thuringiensis*) causaron lesiones necróticas en piel cinco días después de la administración (datos no mostrados). Cuatro de cinco ratones inyectados con C-9 mostraron úlceras de 1.0, 1.0, 1.2, y 1.4 cm de diámetro, y en los ratones inoculados con C-4 y HD-41 se observaron úlceras de 0.4-0.6 y 0.8-0.9 cm de diámetro, respectivamente. El tejido de los ratones Balb/c inyectados con GM-7 y GM-10 no sufrió alteraciones, se observaron intactos los vasos sanguíneos y las células de músculo esquelético en el área inyectada, mientras que el tejido de los ratones tratados



Fig. 2. Productos de PCR de cepas de *B. thuringiensis* con primers *cry1*. Las flechas indican los marcadores de referencia del carril 1 (BIOLINE). Los carriles 2-8, las cepas HD-73, Bt *tenebrionis* (control positivo) C-4, C-9, GM-7, GM-10 y sin DNA.

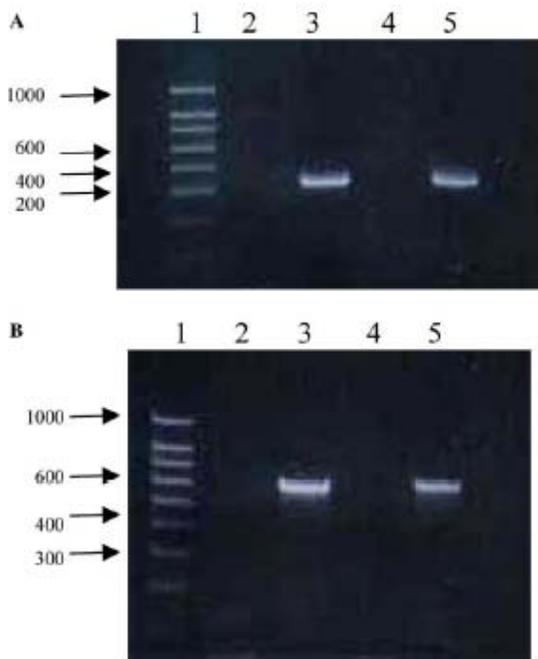


Fig. 3. Productos de PCR de cepas de *B. thuringiensis* con primers *cry3* (A) y *cry7/8* (B). Las flechas indican los marcadores de referencia del carril 1 (BIOLINE). Los carriles 2-5, las cepas HD-73, (controles positivos) *Bt tenebrionis* (A) y HD-867 *kumamotoensis* (B), C-4 y C-9.

con la cepa C-9 se observó un aumento de 3x en la infiltración de polimorfos y macrófagos, de leucocitos comparada con los ratones con HD-41 (figura 4).

Además, se observó que los cristales de las cepas C-4 y C-9 fueron los responsables de las lesiones, ya que las esporas y el sobrenadante no se asoció con las necrosis, contrario a lo observado en HD-41, donde el sobrenadante fue el responsable (tabla I).

Se aisló *Bt* del tejido necrótico de los ratones que habían sido inyectados con la mezcla de esporas de las cepas C-9 y HD-41. En los experimentos planeados para elucidar los mecanismos de inducción de necrosis en el tejido subcutáneo por las esporas de C-4 y C-9, se observó que el tratamiento con pentoxifilina inhibió el efecto necrótico inducido por las esporas (figura 5).

**Discusión**

Pruebas de laboratorio y campo mostraron que las

cepas evaluadas en este estudio tienen actividad insecticida similar a la del estándar HD-1 que se usa en productos comerciales.<sup>2,3</sup> Además, el rendimiento de C-4, GM-7, y GM-10 por fermentación

Tabla I. Inmunodetecciones de cepas mexicanas y HD evaluadas con varios tipos de anticuerpos policlonales anti-Cry.

Aislado de <i>Bacillus thuringiensis</i> , (serotipo)	Tipo de Anti Cry			
	1Ab	1Ac	3C	7Aa
C-4, ( <i>kumamotoensis</i> )	+	-	-	-
C-9, ( <i>kumamotoensis</i> )	-	+	- <sup>2</sup>	+
GM-7, ( <i>aizawai</i> )	+	-	-	-
GM-10, ( <i>aizawai</i> )	+	-	-	-
C-14, ( <i>tenebrionis</i> )	N. D. <sup>1</sup>	N. D.	N. D.	+
GM-33, ( <i>ostriniae</i> )	N. D.	N. D.	+	N. D.

<sup>1</sup>N. D. = no se determinó; - = no se detectó; + = se detectó.

<sup>2</sup> Positivo para los primers putativos *cry 3* y *cry 7/8* por análisis de PCR.

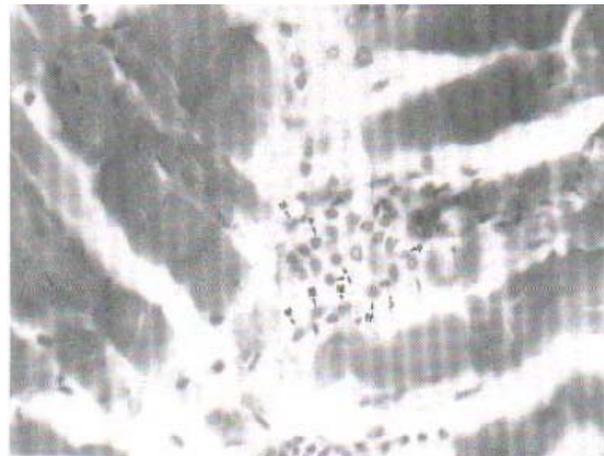


Fig. 4. Micrografía de cortes histológicos de ratones Balb/c a 7-d de ser inyectados subcutáneamente con cristales de la cepa C-9 a 60x. M=macrófagos, P=polimorfonucleares.

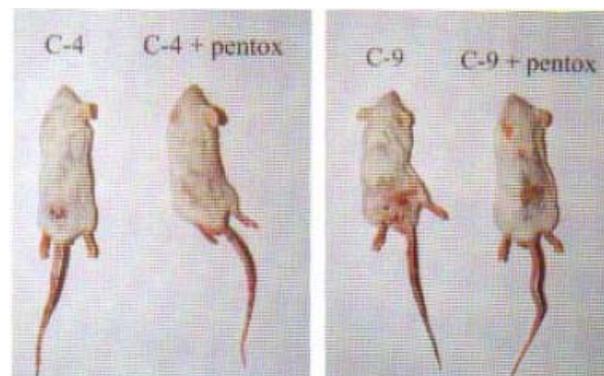


Fig. 5. Ratones Balb/c a 7-d de ser inyectados subcutáneamente con 200 µl de 10<sup>6</sup> de esporas y cristales de las cepas C-4 ó C-9, y con 200 µl de pentoxifilina (150 mg/Kg) ambos en solución en PBS.

fue similar o incluso mayor a la producción de la cepa de Bt con mayor capacidad de producir este material, la cepa HD-187.<sup>2,27</sup> Estos resultados sugieren considerar su uso como bioinsecticidas. En los estudios bioquímicos se demostró similitud de los serotipos para la asimilación y fermentación de varias fuentes de carbono, con ciertas diferencias esperadas entre ellas.<sup>27</sup> Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos mostraron algunas diferencias que se consideran normales en cepas de suelo.<sup>28</sup> Las cepas que mostraron la más alta actividad insecticida contra las especies de lepidópteros probadas, GM-7 y GM-10,<sup>2</sup> fueron susceptibles a los fagos CP-51 y R-41. Tassel y Yousten<sup>29</sup> también demostraron que algunas de las variedades de Bt que se probaron fueron susceptibles al fago CP-51. Esto se considera una característica indeseable en campo.<sup>30</sup> Sin embargo, las pruebas con bacteriófagos de Bt mostraron que el tiempo que se requería para que la larva tratada con Bt muriera se incrementaba, sin reducir el porcentaje final de mortalidad.<sup>31</sup> En estudios sobre la toxicidad de la  $\delta$ -endotoxina contra plagas del maíz, Bohorova *et al.*,<sup>32</sup> reportaron que un solo tipo de  $\delta$ -endotoxina puede ser activa contra todas las especies plagas en campo. Las cepas GM-7 y GM-10 tuvieron reactividad cruzada con anticuerpos contra *cry1*, y se identificaron con *primers* para *cry1*. Aunque la cepa C-9 tuvo actividad contra coleópteros, y ésta presenta genes putativos para *cry3* y *cry7/8*, concuerda con reportes anteriores.<sup>33</sup> Estos resultados confirman que C-9 posee un gen *cry* del tipo *cry7* ó *cry8*. Se observó, además, que los cristales ( $\delta$ -endotoxina) de C-4 y C-9 causaron necrosis tisular luego de la administración subcutánea en ratones de una mezcla de  $10^6$  esporas-cristales, sin causar mortalidad, ni después de aplicar una dosis de  $10^7$  esporas. Por el contrario, se sabe que tres esporas o células vegetativas de *B. antracis* causan la muerte de un sólo ratón.<sup>35</sup>

Se ha reportado que la necrosis tisular inducida por estas cepas podría ser causada por el ácido lipoteicoico, el cual se encuentra en la pared celular de varias especies de *Bacillus*.<sup>36</sup> Éste, a su vez, puede estimular la producción del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) por los macrófagos tisulares (19,25). La pentoxifilina, disminuye la producción del TNF- $\alpha$ .<sup>37</sup> En el presente estudio, los ratones se recuperaron después de aplicación de pentoxifilina, lo cual indicó que puede combatir a Bt eficazmente por la respuesta inmune del huésped.

## Resumen

Se caracterizaron las cepas de *Bacillus thuringiensis* C-4, C-9, GM-7, y GM-10, que fueron aisladas del noreste de México, y seleccionadas por su alta toxicidad contra lepidópteros y coleópteros de importancia agrícola, siguiendo las guías de la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos de Norte América. La serotipificación reveló que ninguna de las cepas estudiadas produjo  $\beta$ -exotoxina o fue activa contra mosquitos. Se encontró que GM-7 y GM-10 fueron sensibles a los fagos R-41 y CP-51. Todas las cepas sintetizaron proteínas del cristal de 130–140 kDa. Las cepas C-4, GM-7, y GM-10 expresaron genes *cry1*, y la C-9 expresó los genes *cry3* y *cry7/8*. Además, se observó que sólo la  $\delta$ -endotoxina (cristal) de C4 y C9, solas o en combinación con esporas, causaron necrosis tisular cuando se inyectaron subcutáneamente, y ésta fue similar a la causada por la cepa productora de  $\beta$ -exotoxina HD-41. Esta necrosis se suprimió significativamente con el uso de pentoxifilina, que es un inhibidor de la producción de factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , lo cual sugirió que esta citosina estuvo involucrada en el efecto observado. Los resultados demuestran que las cepas GM-7 y GM-10 son seguras para mamíferos de acuerdo a los lineamientos de la EPA. Además, se discute el potencial de la cepa C-9 para el control de varios coleópteros de importancia agrícola, y la inducción de necrosis tisular en ratones por C-4 y C-9.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, Caracterización de la EPA; Efectos histopatológicos en ratones; Biopesticida; Citotoxicidad por la  $\delta$ -endotoxina.

## Abstract

*Bacillus thuringiensis* strains C-4, C-9, GM-7, and GM-10, isolated from the northeast of Mexico and selected for their high toxicity against lepidopteran and coleopteran pests, were characterized following United States Environmental Protection Agency (EPA)'s guidelines. None of the tested strains produced  $\beta$ -exotoxin or showed activity against mosquitoes. GM-7 and GM-10 were sensitive to R-41 and CP-51 phages. All strains synthesized Cry proteins of 130–140 kDa. C-4, GM-7, and GM-10 strains expressed *cry1* genes, and C-9 expressed *cry3* and *cry7/8* genes. GM-7 and GM-10 were sensitive to R-41 and CP-51 phages. When the  $\delta$ -endotoxin (crystal) from

the four strains were subcutaneously injected to Balb/c mice, alone or in combination with spores, only C-4 and C-9 provoked tissue necrosis similar to that caused by the  $\beta$ -exotoxin producer HD-41. Tissue necrosis was prevented with the injection of pentoxifylline, an inhibitor of tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) production, suggesting a role of this cytokine in the observed effect. Our results demonstrated that GM-7 and GM-10 strains are safe for mammals under EPA regulations.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; EPA characterization; Histopathological effects on mice; Biopesticide;  $\delta$ -endotoxin, Cytotoxicity.

## Referencias

- Feitelson, J.S., Payne, J., Kim, L., 1992. *Bio/Technology* 10, 271–275.
- Tamez-Guerra, P., Castro-Franco, R., Medrano-Roldán, et al. 1998. *J. Econ. Entomol.* 91, 86–93.
- Tamez-Guerra, P., García-Gutiérrez, C., Medrano-Roldán, et al. 1999. *Southwest. Entomol.* 24, 874 37–46.
- Pereyra-Alferez, B., Sánchez-Alejo, E., Flores-Guerra, A.C., et al. 1999. In: Zinui, Y., Ming, Zidou, L. (Eds.), *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*. Science Press, Beijing, NY, pp. 21–25.
- Betz, F.S., Forsyth, S.F., Stewart, W.E., 1990. In: Laird, M., Lacey, L.A., Davidson, E.W. (Eds.), *Safety of Microbial Insecticides*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 3–10.
- US-EPA (United States EPA). 1988. *Guidance for the registration of Bacillus thuringiensis*. Washington, DC.
- SENASICA (Subdirección de Evaluación y Registros de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria), 1998. *CICLOPLASFEST*. Dirección de Sanidad Vegetal, SARH.
- Sneath, P.H.A., 1986. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. II. Williams & Wilkins, pp. 1104–1138.
- De Barjac, H., Frachon, F., 1990. *Entomop.* 35, 233–240.
- Martin, P.A.W., 1989. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2437–2442.
- Martin, P.A.W., et al. 1985. *Bio-Techniques* 3, 386–392.
- Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D., et al. 1999. In: *Manual of Clinical Microbiology*. AMS Wash, DC, pp. 1526–1543.
- Krieg, N.R., 1981. In: *Manual of Methods for General Microbiology*. ASM, Wash, DC, p. 140.
- Pietrantonio, P.V., Gill, S.S., 1992. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 295–302.
- Hoefer Sci Instruments, 1993. *Basic techniques and exercise in electrophoresis*. San Francisco, CA.
- Laemmli, U.K., 1970. *Nature* 227, 680–685.
- De Maagd, R.A., van der Klei, H., Bakker, et al. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2753–2757.
- Cerón, J., Ortiz, A., Quintero, et al. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3826–3831.
- Crickmore, N., et al. 1998. *Mol. Biol. Rev.* 62, 807–813.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., et al. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4883–4890.
- Bravo, A., Saravia, S., López, L., et al. 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4965–4972.
- Arévalo-Niño, K., Galán-Wong, L.J., 1994. *Southwest. Entomol.* 19, 385–391.
- Hernyez, C.S., Ferre, J., Larget-Thierry, I., 2001. *J. Appl. Microbiol.* 90, 643–647.
- Montagna, W., Carlisle, K.S., Brenner, R.M., 1987. *Am. J. Dermatopathol.* 9, 26–29.
- Doherty, G.M., Jensen, J.C., Alexy, H.R., Buresh, C.M., Norton, J.A., 1991. *Surgery* 110, 192–198.
- Yokoyama, Y., Ohmori, I., Kohda, K., Kawazoe, Y., 1991. *Anticancer Res.* 11, 1625–1628.
- Dulmage, H.T., De Barjac, H., 1973. *J. Invertebr. Pathol.* 22, 273–277.
- Gordon, R.E., 1973. The genus *Bacillus*. In: *Handbook of Microbiology*, vol. I. CRC Press, Clevely, OH, pp. 71–88.
- Tassel, V., Yousten, A.A., 1976. *Can. J. Microbiol.* 22, 583–586.
- Debabov, V.G., Azizbekyan, R.R., et al. 1984. In: *Genetics y Biotechnology of Bacilli*. Academic Press, NY, pp. 345–359.
- Raun, E.S., et al. 1966. *J. Invertebr. Pathol.* 8, 365–375.
- Bohorova, N., et al. 1997. *J. Econ. Entomol.* 90, 412–415.
- Uribe, D., et al. 2003. *J. Invertebr. Pathol.* 82, 119–127.
- Cox, G.W., et al. 1992. *J. Immunol.* 149, 3290–3296.
- Siegel, J.P., 2001. *J. Invertebr. Pathol.* 77, 13–21.
- Iwasaki, H., et al. 1986. *J. Bacteriol.* 167, 508–516.
- Keller, R., et al. 1992. *Infect. Immunol.* 60, 3664–3672.